

L-缬氨酸发酵的研究

中国科学院微生物研究所氨基酸组*

(北京)

北京棒状杆菌 (*Corynebacterium pekinense*) AS 1.299 经硫酸二乙酯诱变处理后, 获得一株突变体 AS 1.586, 可积累大量的 L-缬氨酸。

利用生长图形法对 AS 1.586 突变株进行营养要求测定, 结果证明该菌株除要求异亮氨酸作为生长因子外, 还可利用异亮氨酸生物合成途径上的中间产物如高丝氨酸、苏氨酸等作为生长因子。因此, 是一株不严格缺陷型突变株。

对该突变株的缬氨酸发酵条件研究指出, 通气量大小是影响缬氨酸产量高低的重要因素。在 500 升发酵罐放大试验中, 12 小时前通风量为 1:0.7 (体积/体积/分), 12 小时后提高风量达 1:0.9 (体积/体积/分), 发酵 43 小时, L-缬氨酸产量达 26.8 毫克/毫升, 糖转化率为 26% 以上。

L-缬氨酸为人体必需氨基酸之一, 是制造复合氨基酸注射液和合成一些重要医药的原料。

利用微生物发酵法生产 L-缬氨酸已受到人们的重视。近年来, 已有不少研究报告和专利^[1-4]。

我们利用硫酸二乙酯诱变处理北京棒状杆菌^[5], 获得一株突变株 AS 1.586 可在发酵液中积累大量的 L-缬氨酸。现将研究结果报告如下。

材料和方法

一、菌种

北京棒状杆菌 AS 1.586, 系经硫酸二乙酯诱变北京棒状杆菌 AS 1.299 获得的突变株。

二、培养基

普通肉汁琼脂斜面, 其组成 (%) 为牛肉膏 0.5 (或牛肉汁), 蛋白胨 1.0, 氯化钠 0.5, 琼脂 1.8。pH 7.2。完全培养基组成 (%) 为牛肉膏 1.0, 蛋白胨 1.0, 酵母膏 0.5, 氯化钠 0.5, 琼脂 2.0, 自来水。pH 7.0。基础培养基组成 (%) 为葡萄糖 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, K_2HPO_4 0.1, 生物

素 20 微克/升, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 各 2 毫克, 水洗琼脂 2.0, 蒸馏水。pH 7.0。发酵培养基见各试验项目。

三、发酵培养

接种后置迴转式摇床 (198 转/分, 偏心距 2.5 厘米) 上, 于 30°C 振荡培养。

四、缬氨酸的定量

采用比色定量法^[6], 由标准曲线计算发酵液中缬氨酸含量。

五、诱变和氨基酸营养要求的测定

将 AS 1.299 新鲜斜面培养物接种于完全液体培养基内, 于 30°C 振荡培养 18 小时, 离心集菌, 所得菌体细胞用生理盐水洗涤 3 次, 并以磷酸缓冲液 (pH 7.0) 调制成浓度为 5×10^8 细胞/毫升菌液。取 10 毫升菌液加入到含有 0.2 毫升硫酸二乙酯的 200 毫升三角瓶中, 30°C 振荡 20 分钟。然后吸取 0.1 毫升菌液至含有 10 毫升完全培养基的三角瓶内, 30°C 振荡培养 18 小时, 再以生理盐水适当稀释, 取一定量涂在完全培养基平板上, 置 30°C 温箱培养 48 小时。

采用影印法测定平板上出现的菌落。将初次

本文于 1975 年 5 月 14 日收到。

* 北京人民食品厂曾参加部分工作。

获得的营养缺陷型突变株进一步用基础培养基和基础培养基内含有酪素水解物的选择培养基上挑选氨基酸营养缺陷型突变株。将确定为氨基酸营养缺陷型者移至肉汁琼脂斜面上,供发酵筛选用。

结果与讨论

一、突变株 AS 1.586 的获得及其生长中对氨基酸的要求

北京棒状杆菌 AS1.299 经硫酸二乙酯诱变处理后,获得一大批氨基酸营养缺陷型突变株(参见方法部分),经发酵试验发现 AS1.586 菌株积累大量缬氨酸。采用生长图形法测定该突变株对氨基酸要求的情况(表 1)。

表 1 AS 1.586 菌株对氨基酸的要求

氨基酸种类	时间(时)		24	72
	生长与否			
无	-	-	-	+
甘氨酸	-	-	-	+
丙氨酸	-	-	-	+
天门冬氨酸	-	-	-	+
谷氨酸	-	-	-	+
苏氨酸	+	+	+	+
缬氨酸	-	-	-	+
丝氨酸	-	-	-	+
脯氨酸	-	-	-	+
蛋氨酸	-	-	-	+
胱氨酸	-	-	-	+
精氨酸	-	-	-	+
赖氨酸	-	-	-	+
组氨酸	-	-	-	+
亮氨酸	-	-	-	+
色氨酸	-	-	-	+
酪氨酸	-	-	-	+
苯丙氨酸	-	-	-	+
高丝氨酸	±	±	±	+
异亮氨酸	+++	+++	+++	+++
半胱氨酸	-	-	-	+
α-氨基丁酸	+	+	+	++

注:测定时菌体细胞经生理盐水洗涤 3 次。
-: 不生长; ±: 生长弱;
+: 明显地生长; +++: 生长丰富。

AS1.586 突变株除明显地要求异亮氨酸之外,还分别要求苏氨酸,高丝氨酸和 α-氨基丁酸作为生长因子。然而,有趣的是当延长培养时间至 72 小时后,在不加或加有任何一种所试的氨基酸时都可正常生长。表 2 的试验结果又证明了该菌在缺乏异亮氨酸的条件下仍可积累大量缬氨酸;反之,当异亮氨酸的用量达到 500 微克/毫升时,则明显地抑制缬氨酸的产量。

表 2 L-异亮氨酸浓度对 AS 1.586 菌株产生缬氨酸的影响

L-异亮氨酸浓度 (微克/毫升)	发酵终 pH	菌体生长 (光密度×10)	L-缬氨酸产量 (毫克/毫升)
0	6.4	1.05	17.1
10	6.7	1.10	18.9
25	6.7	1.08	21.0
50	6.7	1.10	17.6
100	7.0	1.07	18.9
250	7.2	1.07	13.3
500	7.5	1.09	7.5

注: 1. 发酵基础培养基组成(%): 葡萄糖 10, (NH₄)₂SO₄ 3.0, K₂HPO₄ 0.1, MgSO₄·2H₂O 0.04, FeSO₄·7H₂O 0.002, MnSO₄·H₂O 0.02, 生物素 30 微克/升, 硫胺素 200 微克/升。pH 7.0。CaCO₃ 3.0。500 毫升三角瓶, 分装发酵培养基 20 毫升。
2. 接种量为 2% (接种前菌体细胞经生理盐水洗 3 次)。
3. 28℃ 下摇床振荡培养 72 小时。
4. 原株 AS 1.299 在发酵基础培养基内不产缬氨酸。

二、通气条件对产 L-缬氨酸的影响

试验采用 500 毫升三角瓶分装不同量发酵培养基,接种后于迴转式摇床上 30℃ 振荡培养 72 小时,结果(图1) 500 毫升三角瓶装 20 毫升培养基时缬氨酸产量最高。同时还发现在培养基装量 25—80 毫升时,发酵液中丙氨酸、谷氨酸及赖氨酸的积累量明显增加,缬氨酸产量下降(图 2)。

梶原等^[7]报告乳糖发酵短杆菌的苏氨酸营养缺陷型突变株的缬氨酸发酵受铜、锰和铁离子的控制而发生“代谢转换”现

象。而 AS1.586 菌株的发酵产物则明显受通气量大小的影响, 不同于已经报告过的任何菌株。因此, 在缬氨酸发酵中除选择适宜的菌株之外, 外界条件所起的作用是

不容忽视的。

三、培养基中玉米浆用量对 L-缬氨酸产量的影响

试验了种子培养基和发酵培养基中玉米浆用量对缬氨酸产量的影响, 结果种子培养基内玉米浆用量对缬氨酸产量影响不明显, 0.5—1.0% 用量已足够。发酵培养基中玉米浆用量从 0.3—1.0% 时, 随玉米浆用量的增加缬氨酸产量亦相应增加; 1.0—2.0% 时缬氨酸产量增加不明显, 但高于 2.0% 以上时缬氨酸产量显著降低(图 3、4)。

四、发酵培养基中硫酸铵、碳酸钙用量与 L-缬氨酸产量的关系

试验表明硫酸铵用量在 1.0—3.5% 范围内, 缬氨酸产量是递增的(图 5); 而培养基中碳酸钙的用量在 2.0—3.0% 之间对缬

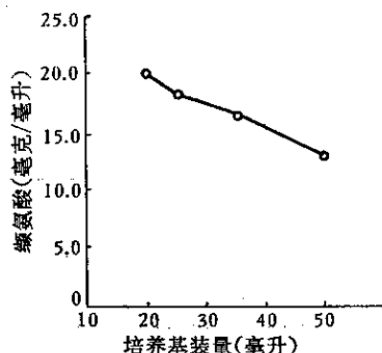


图 1 通气状况对产缬氨酸的影响

发酵培养基组成(%): 葡萄糖 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, K_2HPO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, 玉米浆 2.0, 味精废液 0.5, 自来水。pH 7.0。CaCO₃ 2.0。采用肉汁琼脂斜面种子。发酵 72 小时。

异亮氨酸+亮氨酸

缬氨酸

丙氨酸

谷氨酸

赖氨酸

胱氨酸

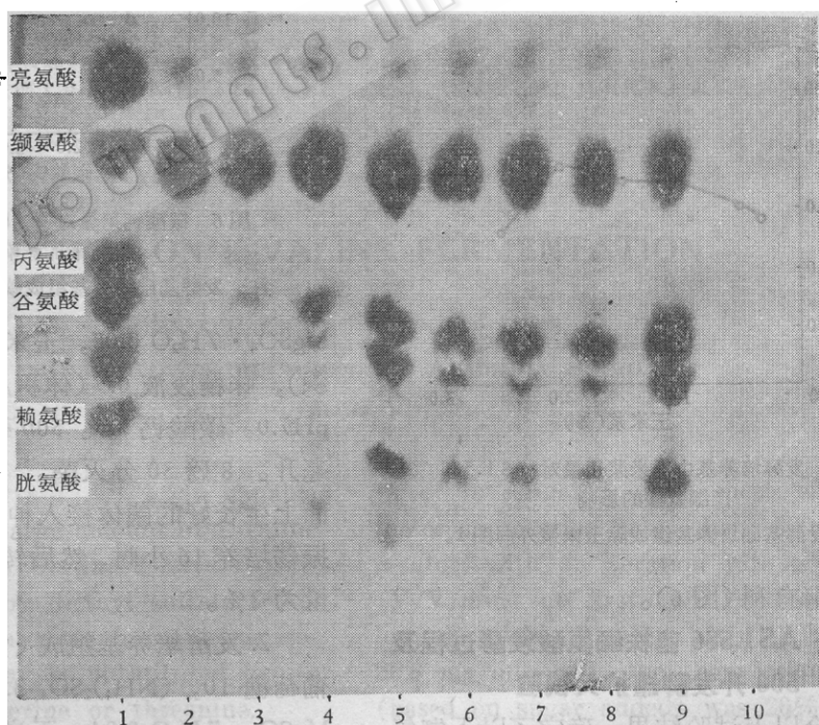


图 2 通气条件与 AS1.586 菌株产生氨基酸的关系

注: 1. 标准氨基酸样品; 2、3、4、6、7 及 8 为 500 毫升三角瓶分别装 15、20、25、35、50 及 80 毫升发酵培养基经发酵后的试样; 5 为试样 4 + 丙、谷、赖三种标准氨基酸; 10 为未接种的发酵培养基。

层析溶剂系统 正丁醇: 冰醋酸: 水 = 4:1:1

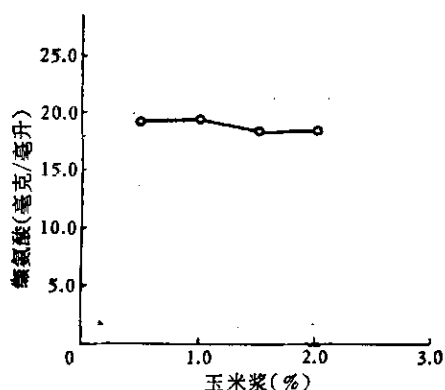


图3 种子培养基中玉米浆含量对 AS1.586 菌株产缬氨酸的影响

注1. 种子基础培养基组成(%): 葡萄糖 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, K_2HPO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 味精废液 0.5, 自来水, pH7.0, CaCO_3 0.5。500 毫升三角瓶装 50 毫升。28—30℃, 摇床培养 16 小时。接种量 2%。

2. 发酵培养基组成(%): 葡萄糖 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.5, K_2HPO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, 玉米浆 1.0, 味精废液 0.5, 自来水, pH7.0, CaCO_3 3.0。

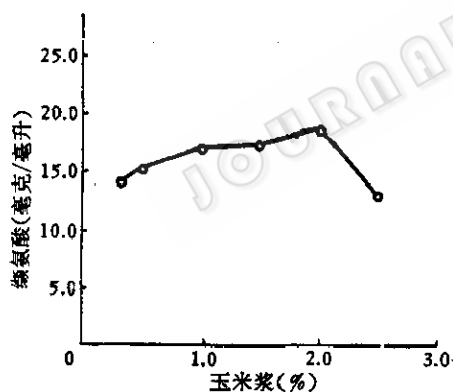


图4 发酵培养基中玉米浆用量对 AS1.586 产缬氨酸的影响

注: 发酵基础培养基组成除玉米浆外同图1。

氨酸发酵有利(图6)。

五、AS1.586 菌株缬氨酸发酵过程及 500 升发酵罐扩大试验

综合以上试验结果, 确定了以下缬氨酸发酵条件:

1. 种子培养基组成(%)及培养条件: 葡萄糖 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, K_2HPO_4 0.1,

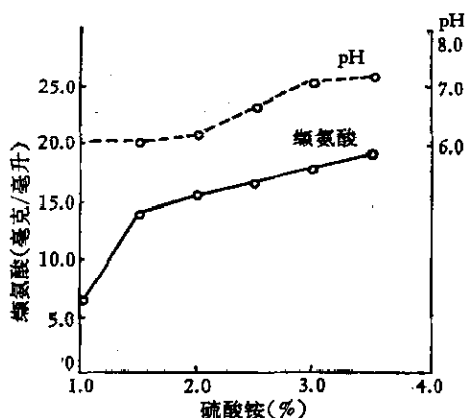


图5 硫酸铵用量对 AS1.586 菌株产缬氨酸的影响

注: 发酵基础培养基组成除硫酸铵外同图3。

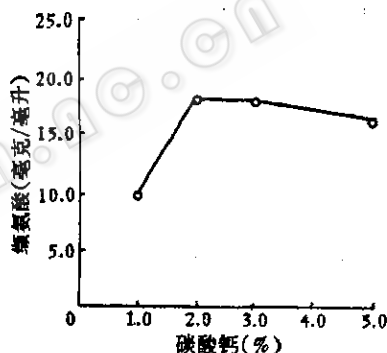


图6 碳酸钙用量对 AS1.586 菌株产缬氨酸的影响

注: 发酵基础培养基组成除碳酸钙外同图3。

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 玉米浆 1.0 (重量/体积), 味精废液 0.5 (体积/体积), 自来水。pH7.0。碳酸钙 0.5。500 毫升三角瓶装 50 毫升。8 磅 30 分灭菌。取在肉汁琼脂斜面上生长好的菌体接入种子瓶内, 30℃ 下振荡培养 16 小时, 然后转入发酵瓶, 接种量为 2%。

2. 发酵培养基组成(%)及培养条件: 葡萄糖 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0, K_2HPO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, 玉米浆 1.0 (重量/体积), 味精废液 0.5 (体积/体积), 自来水。pH7.0。CaCO₃ 3.0。500 毫升三角瓶, 分装 20 毫升培养基, 8 磅 30 分灭菌。接种后,

于 30℃ 振荡培养 72 小时。

试验按二种方式进行。一是摇瓶稳定产酸试验; 一是 500 升罐放大试验。前者 L-缬氨酸产量在 20 毫克/毫升以上(表 3);

后者发酵 43 小时缬氨酸产量达 26.8 毫克/毫升, 糖转化率达 26% 以上(图 7), 发酵周期缩短, 缬氨酸产量提高。

表 3 AS 1,586 摇瓶发酵 L-缬氨酸产量

批 次	L-缬氨酸产量(毫克/毫升)
1	25.0
2	21.1
3	21.4
4	21.3
5	23.0

参 考 资 料

- [1] Nakayama, K. et al.: J. Gen. Appl. Microbiol., 7:52—69, 1961.
- [2] 奥村信ニウ: 特许公报, 昭 42—513, 1967.
- [3] Ihio, R. et al.: J. Gen. Appl. Microbiol., 13: 217—225, 1967.
- [4] 高山健一郎ウ: Amino Acid and Nucleic Acid, 19: 121—129, 1969.
- [5] 陈琦、张震元、李玲阁: 微生物学报, 13: 1—6, 1973.
- [6] 潘家秀等: 蛋白质化学研究技术, 科学出版社, 第 27—28, 79—81 页, 1962.
- [7] 梶原端之ウ: 日农化大会讲演要旨集 158—159, 1968.

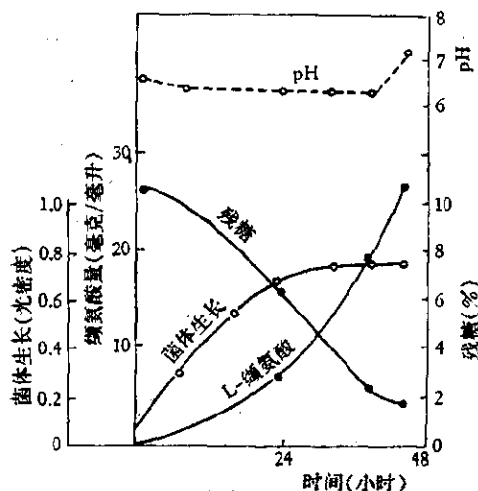


图 7 AS 1,586 菌株 500 升罐缬氨酸发酵过程

注: 一级种子种龄 16 小时, 二级种子种龄 8—10 小时。搅拌转速 190—220 转/分。通风量: 12 小时前 1:0.7, 12 小时后 1:0.9 (体积/体积/分)。

STUDIES ON L-VALINE FERMENTATION

RESEARCH GROUP OF AMINO ACIDS,
INSTITUTE OF MICROBIOLOGY, ACADEMIA SINICA
(Beijing)

A mutant strain AS 1586 capable of accumulating large amount of L-valine was derived from *Corynebacterium pekinense* AS 1299 by diethyl sulfate treatment. It is an auxotroph requiring isoleucine, which may be substituted by its precursors homoserine or threonine.

Factors influencing valine formation

were investigated. The most effective factor is aeration rate. In a 500 l fermentor, with an aeration rate of 1:0.7 (V/V/min) at first and 1:0.9 after 12 hrs, the yield of valine after 43 hrs was 26.8 mg/ml and the conversion rate (based on sugar added) was 26%.